

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 958 753**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
②① N° d'enregistrement national : **10 52784**

⑤① Int Cl⁸ : **G 01 N 33/531** (2006.01), G 01 N 33/569

①② **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** **A1**

②② Date de dépôt : 13.04.10.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 14.10.11 Bulletin 11/41.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT DE RECHERCHE POUR
LE DEVELOPPEMENT (IRD) Etablissement public —
FR.

⑦② Inventeur(s) : HOLZMULLER PHILIPPE, SEMBALLA
SILLA, VINCENTEAU PHILIPPE et CUNY GERARD.

⑦③ Titulaire(s) : INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE
DEVELOPPEMENT (IRD) Etablissement public.

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ARMENGAUD AINE.

⑤④ **CONSTRUCTION ANTIGENIQUE ET SES APPLICATIONS POUR LE DEPISTAGE DE TRYPANOSOMES
CHEZ L'HOMME ET L'ANIMAL.**

⑤⑦ L'invention a pour objet une construction antigénique
renfermant un épitope tryptophane, caractérisée en ce qu'elle
est formée d'un motif tryptophane W, ou d'un peptide de
3 ou 4 acides aminés comportant un motif W, couplé à du
glutaraldéhyde.

Application au dépistage de la trypanosomose humaine
ou animale.

FR 2 958 753 - A1



Construction antigénique et ses applications pour le dépistage de trypanosomoses chez l'homme et l'animal

L'invention a pour objet une construction antigénique et son utilisation pour élaborer un kit et mettre en œuvre une méthode de dépistage de trypanosomoses chez l'homme et l'animal.

La trypanosomose africaine humaine (THA) et la trypanosomose animale (TAA) affectent principalement les communautés rurales pauvres et sont bien souvent des maladies négligées, qui posent un grave problème de santé publique et un frein au développement économique de nombreux pays. La plus grande difficulté pour le contrôle de ces maladies résulte de la grande variabilité de la symptomatologie clinique associée au manque de sensibilité et de spécificité ou à la lourdeur de réalisation des tests de dépistage disponibles.

Un criblage actif de la population à risque est donc essentiel pour identifier précocement les individus infectés et réduire la transmission en diminuant le réservoir de parasites. De plus, un dépistage de THA doit inclure un diagnostic de stade 1 (lymphatico-sanguin) ou 2 (neurologique), car les patients en stade 2 sont traités au méléarsoprol dont les effets secondaires toxiques sont importants (mortalité globale de 5-10%). Le diagnostic de stade dépend encore aujourd'hui de l'examen du liquide céphalo-rachidien après ponction lombaire et le seuil de positivité de la cytorachie fait toujours débat (5, 10 ou 20 cellules/ μ l).

Actuellement, le CATT (Card Agglutination Test For Trypanosomiasis)/*T. b. gambiense* correspond au test sérologique le plus couramment utilisé. Le test comporte des trypanosomes fixés du variant LiTat 1.3. Une variante du CATT se compose d'antigènes semi-purifiés (LiTat 1.3, 1.5 et 1.6) couplés à des billes de latex. Le principal problème lié au CATT est un manque de spécificité car les antigènes utilisés sont responsables de nombreuses réactions croisées et donc de faux-positifs. De plus, le sang, le sang dilué ou le plasma ont des titres anticorps variables contre ces antigènes. C'est ainsi que des patients parasitologiquement positifs peuvent être négatifs au CATT. Enfin, le CATT ne permet pas le diagnostic de stade et un suivi sérologique satisfaisant des patients après traitement en particulier à cause des réactions croisées avec d'autres infections.

On mesure donc l'intérêt de disposer de nouveaux antigènes pour améliorer le dépistage, la détermination des stades et le suivi des THA et des TAA. Bien que quelques antigènes se soient révélés intéressants d'un aspect pathophysiologique, leur manipulation en conditions de terrain (Semballa *et al.*, 2004 (réf. 1)) s'est avérée difficile.

Les épitopes tryptophane (WE) qui représentent des antigènes constants du trypanosome induisent les anticorps spécifiques chez l'hôte (homme ou animal). Ces épitopes comprennent l'acide aminé L-tryptophane et sont situés dans des domaines constants de la partie C-terminale des glycoprotéines variables de surface (VSG). Des titres élevés d'anticorps anti-WE d'isotype IgM ont été mesurés par ELISA dans le sérum des patients atteints de trypanosomose humaine africaine (THA), et des titres accrus ont été trouvés chez les patients en stade 2 (Okomo-Assoumou *et al.*, 1995(réf. 2)).

Ces résultats pionniers avaient été obtenus par le laboratoire des inventeurs grâce à des épitopes synthétiques proposés pour étudier leur reconnaissance par des anticorps anti-WE, notamment des constructions WE-glutaraldéhyde- BSA. Dans ces constructions, le glutaraldéhyde joue le rôle de fixateur entre l'antigène synthétique WE et la protéine porteuse (ici l'albumine bovine BSA). Ces constructions ont permis de démontrer le potentiel de l'épitope WE comme cible diagnostique.

Les travaux des inventeurs dans ce domaine ont montré un effet inattendu du glutaraldéhyde portant sur l'orientation optimale qu'il confère à l'antigène synthétique. En effet, il est apparu que le glutaraldéhyde sert de bras espaceur et orientateur de l'antigène synthétique WE lorsque celui-ci est couplé à un support inerte tel que des billes de latex ou des plaques ELISA. La construction antigénique de l'invention constitue un mimotope de l'antigène naturel, lorsqu'il est couplé uniquement à ce dernier, ce qui permet une meilleure reconnaissance par des anticorps anti-WE.

L'invention a donc pour but de fournir une nouvelle construction antigénique. Elle vise également la mise à profit des propriétés de cette construction dans un kit et une méthode de dépistage des trypanosomoses humaines et animales.

La construction antigénique de l'invention repose sur le couplage d'un épitope d'intérêt à du glutaraldéhyde et leur fixation sur un support inerte. L'invention vise ainsi une construction antigénique renfermant un épitope tryptophane, caractérisée en ce qu'elle est formée d'un motif tryptophane W, ou d'un peptide de 3 ou 4 acides aminés comportant un motif W, couplé à du glutaraldéhyde.

De préférence ledit peptide répond à la séquence SEQ ID N°1 C-x-W-y, dans laquelle « x » représente K, A, S, V, T, R, I, E, D, N ou G, et « y » représente D, S, T, E, N, K, G, Q, R ou I, l'un ou l'autre de « x » ou de « y » pouvant être absent .

Une séquence représentative, SEQ ID N°2, est du type CKWD.

Selon une disposition avantageuse, ledit produit de couplage est greffé à des billes de latex. Cette formulation permet de développer une technique rapide d'agglutination sur les sérums de patients ou d'animaux atteints, respectivement, de THA ou de TAA.

Selon une autre disposition, utilisée avantageusement avec la précédente, le produit de couplage est greffé sur des plaques ELISA, permettant de développer une technique quantitative des taux d'anticorps « anti-trypanosomes » chez les patients ou animaux atteints de THA ou TAA.

L'invention vise également un kit de dépistage de THA ou de TAA, caractérisé en ce qu'il comprend

- au moins une construction antigénique telle que définie ci-dessus, avec éventuellement

un ou plusieurs réactifs pour la réaction antigène/anticorps et/ou des solutions tampons et/ou des réactifs pour la détection, la quantification ou la visualisation des complexes antigènes/anticorps lorsqu'ils sont présents.

Le kit ci-dessus comprend avantageusement, selon une disposition supplémentaire de l'invention, les réactifs pour réaliser un test de révélation immuno-enzymatique, notamment un test ELISA indirect ou un test ELISA d'inhibition, faisant entrer en compétition un anticorps monoclonal anti-WE avec les anticorps anti-WE des sérums d'hôtes infectés.

Dans une variante de réalisation, la construction antigénique est fixée à un support.

L'invention vise en outre une méthode de dépistage de THA ou de TAA, caractérisée en ce qu'elle comprend

. la mise en contact d'un échantillon de sérum d'un patient ou d'un animal avec une construction antigénique telle que définie ci-dessus, avantageusement en utilisant un kit tel que décrit ci-dessus,

. la révélation d'une réaction immunologique du type antigène-anticorps. Dans la variante où la construction antigénique est fixée à des billes de latex, la mise en contact avec l'échantillon de sérum conduit à une agglutination du sérum si le patient ou l'animal est respectivement atteint de THA ou de TAA.

Cette méthode diagnostique sérologique permet d'effectuer un dépistage de masse, la détermination du stade et le suivi des THA et des TAA. Elle présente l'avantage d'une grande sensibilité et d'une forte spécificité en évitant les réactions croisées avec d'autres infections (faux positifs) et de faux négatifs (séronégatifs au CATT en parasitologie).

Ce nouveau test diagnostique sérologique, bon marché, stable et facile à manipuler, associé le cas échéant à un test ELISA indirect ou ELISA d'inhibition basé sur les anticorps anti-WE et qui a prouvé son efficacité, pourra être employé pour un diagnostic de masse et de stade (détermination des titres anticorps des patients aux stades 1 et 2) de la

5 THA ou de la TAA sur le terrain, avec une grande spécificité. Ce test est particulièrement approprié pour un dépistage spécifique de la trypanosomose africaine humaine ou animale.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés à titre illustratif dans les exemples qui suivent de réalisation de l'invention. Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 à 3, qui représentent, respectivement,

- 10 - les Figures 1 et 2, les résultats de test diagnostique, respectivement, sur sérum humain et sang, et
- la Figure 3, les taux d'anticorps anti-W dans le sérum de malades atteints de THA (stades 1 et 2).

15 Exemple 1 : synthèse de produits de couplage W-glutaraldéhyde ou C-x-W-y-glutaraldéhyde

Fabrication des billes de latex couplées

A 100 µl d'haptène (tryptophane ou peptide) à la concentration de 5 mg/ml dans un tampon acétate 1,5 M pH 8,3, on ajoute sous vortex pendant 10 secondes environ 100 µl de

20 glutaraldéhyde 5 %.

Sans attendre, on ajoute 50 µl de billes de latex aminés (Sigma) et on laisse réagir pendant au moins 10 mn sous agitation lente.

La réaction est arrêtée par addition de 100 µl de NaBH₄ 1M et laisser le mélange pendant 10 mn encore sous agitation lente.

25 Le mélange est dialysé contre de l'eau distillée additionnée de NaBH₄ (1spatule/5l) toute la journée en changeant l'eau de dialyse 2 à 3 fois, puis environ 14h (toute la nuit) avec de l'eau seilement, pour éliminer l'excès de NaBH₄.

Fabrication des plaques ELISA

30

Par puits de plaque ELISA (Nunc, PolySorp ou MaxiSorp), on ajoute 200 µl d'un mélange de 100µl d'haptène (tryptophane ou peptide, 5 mg/ml dans un tampon acétate 1,5 M pH 8,3) et de 100 µl de glutaraldéhyde 5 % ajouté sous vortex pendant 10 secondes environ. On laisse réagir pendant au moins 30 mn sous agitation lente.

On arrête la réaction par addition de 100 µl de NaBH₄ 1M et on laisse le mélange pendant 10 mn encore sous agitation lente.

Les plaques sont lavées (5 fois 1 heure) avec de l'eau distillée additionnée de NaBH₄ (1spatule/5l), puis environ 14 heures (toute la nuit) avec de l'eau seulement, pour éliminer l'excès de NaBH₄.

Exemple 2 : test diagnostique sur sérum humain (ou animal) avec billes de latex

Pour le dépistage rapide, 20 µl de billes de latex conjugués sont mélangés avec 20 µl de sérums dilués ou non ou 20 µl de sang total. Au bout de 5 à 10 mn, comme illustré sur les Figures 1 (avec sérum) et 2 (avec sang), on observe un anneau caractéristique de la positivité de la réaction. A défaut la réaction est considérée comme négative.

Exemple 3 : test diagnostique associant un test ELISA pour le diagnostique de stade

15

Les résultats obtenus sont illustrés par la Figure 3.

L'utilisation des plaques ELISA avec des sérums de patients atteints de THA montre une augmentation des taux d'anticorps anti-WE lors du passage en stade 2 (atteinte neurologique).

20

Références bibliographiques

- (1) – Semballa et al, experimental Parasitology 115 (2007) 173-180
- (2) – Okomo-Assoumou et al, Ann. J. Trop. Med. Hyg., 1995, pp 461-467

REVENDICATIONS

1 - Construction antigénique renfermant un épitope tryptophane, caractérisée en ce qu'elle est formée d'un motif tryptophane W, ou d'un peptide de 3 ou 4 acides aminés comportant un motif W, couplé à du glutaraldéhyde.

5 2 - Construction antigénique selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit peptide répond à la séquence SEQ ID N°1 C-x-W(-y), dans laquelle « x » représente K, A, S, V, T, R, I, E, D, N ou G, et « y » représente D, S, T, E, N, K, G, Q, R ou I, l'un de « x » ou « y » pouvant être absent.

10 3 - Construction antigénique selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit peptide répond à la séquence SEQ ID N°2 CKWD.

4 - Construction antigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit produit de couplage est greffé à des billes de latex.

5 - Construction antigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit produit de couplage est greffé sur des plaques ELISA.

15 6 - Kit de dépistage de la trypanosomose humaine ou animale, caractérisé en ce qu'il comprend

- au moins une construction antigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, avec éventuellement

20 un ou plusieurs réactifs pour la réaction antigène/anticorps et/ou des solutions tampons et/ou des réactifs pour la détection, la quantification ou la visualisation des complexes antigènes/anticorps lorsqu'ils sont présents.

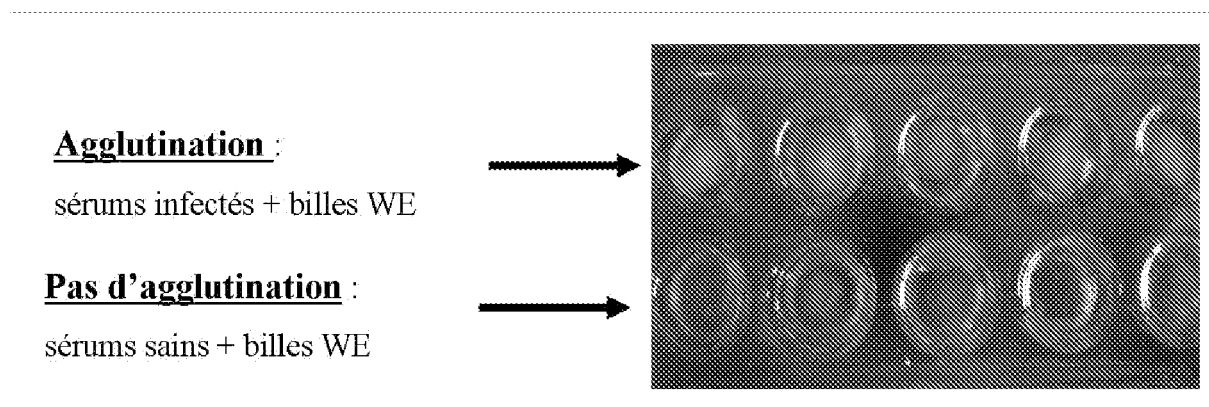
7 - Kit selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend en outre les réactifs pour réaliser un test de révélation immuno-enzymatique, notamment un test ELISA indirect ou un test ELISA d'inhibition, faisant entrer en compétition un anticorps monoclonal anti-WE avec les anticorps anti-WE des sérums d'hôtes infectés.

8 - Kit selon la revendication 6 ou 7, caractérisée en ce que la construction antigénique est fixée sur un support.

9- Kit selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce qu'il est utilisé pour le dépistage de la trypanosomose africaine humaine ou animale.

30 10 - Méthode de dépistage de THA ou de TAA, caractérisée en ce qu'elle comprend
 . la mise en contact d'un échantillon de sérum d'un patient ou d'un animal avec une construction antigénique telle que définie ci-dessus, avantageusement en utilisant un kit selon l'une quelconque des revendications 6 à 9,
 . la révélation d'une réaction immunologique du type antigène-anticorps.

Figure 1



5

Figure 2

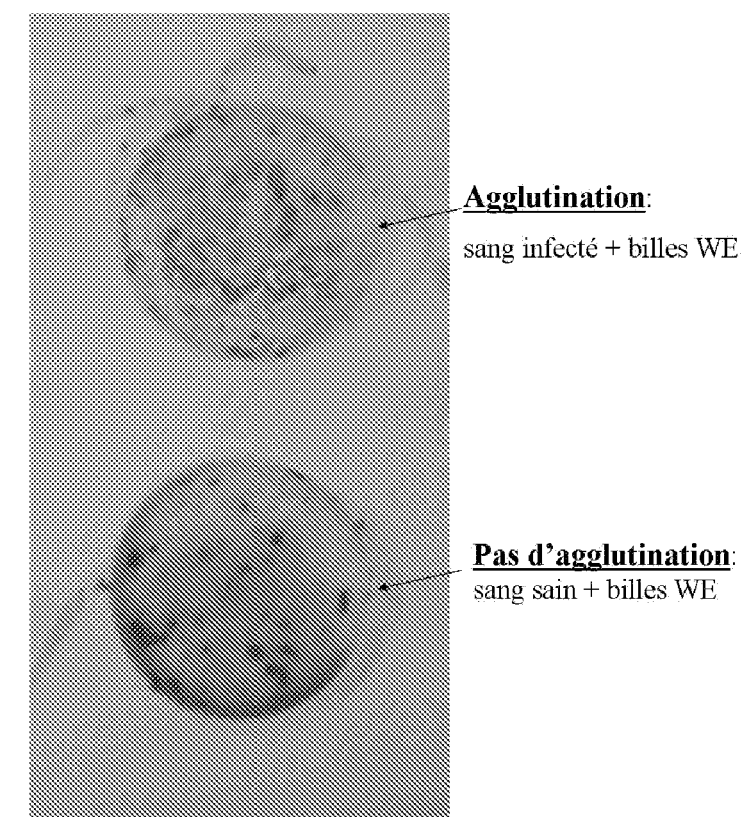
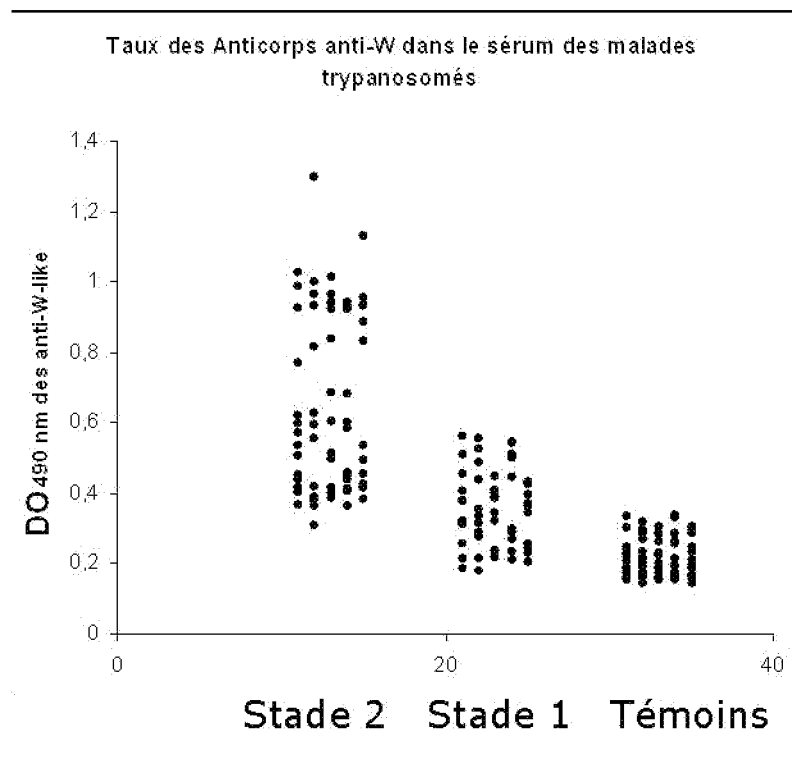


Figure 3



3472 FR.ST25
SEQUENCE LISTING

```

<110>  INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD)
<120>  Construction antigénique et ses applications pour le dépistage de
        trypanosomoses chez l'homme et l'animal
<130>  CP/BB 63127-3472
<160>  2
<170>  PatentIn version 3.3
<210>  1
<211>  8
<212>  PRT
<213>  Artificial sequence

<220>
<223>  Amino acids

<220>
<221>  MISC_FEATURE
<222>  (2)..(2)
<223>  Xaa = K, A, S, V, T, R, I, E, D, N ou G

<220>
<221>  MISC_FEATURE
<222>  (6)..(6)
<223>  Xaa = D, S, T, E, N, K, G, Q, R ou I

<400>  1
Cys Xaa Trp Xaa
1          5

<210>  2
<211>  4
<212>  PRT
<213>  Artificial sequence

<220>
<223>  Amino acids

<400>  2
Cys Lys Trp Asp
1

```



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 738075
FR 1052784

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	SEMBALLA ET AL: "Identification of a tryptophan-like epitope borne by the variable surface glycoprotein (VSG) of African trypanosomes", EXPERIMENTAL PARASITOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 115, no. 2, 29 novembre 2006 (2006-11-29), pages 173-180, XP005727696, ISSN: 0014-4894, DOI: DOI:10.1016/J.EXPPARA.2006.08.008 * le document en entier * * abrégé; figures 1-4 *	1-10	G01N33/531 G01N33/569
X	OKOMO-ASSOUMOU M C ET AL: "Circulating antibodies directed against tryptophan-like epitopes in sera of patients with human African trypanosomiasis", AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE & HYGIENE, AMERICAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, US, vol. 52, no. 5, 1 janvier 1995 (1995-01-01), pages 461-467, XP008129963, ISSN: 0002-9637 * le document en entier * * abrégé; figures 1-3; tableau 1 *	1-10	<div>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)</div> <div>C07K G01N</div>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 décembre 2010		Boiangiu, Clara	
<div>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</div> <div> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire </div> <div> T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant </div>			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 738075
FR 1052784

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI	
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes			
X	VINCENDEAU P ET AL: "Importance of L-tryptophan metabolism in trypanosomiasis", ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, SPRINGER, US, vol. 467, 1 janvier 1999 (1999-01-01), pages 525-531, XP008130027, ISSN: 0065-2598 * le document en entier * * abrégé * * pages 3-5; figure 1 *	1-10		
X	WO 03/068801 A2 (GENENTECH INC [US]; LOWMAN HENRY B [US]; MARVIN JONATHAN S [US]) 21 août 2003 (2003-08-21) * le document en entier * * page 52; revendication 59 * * pages 13,27,34 * * page 52 *	1-5		
X	US 2003/224397 A1 (LOWMAN HENRY B [US] ET AL) 4 décembre 2003 (2003-12-04) * le document en entier *	1-5		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	WO 97/18475 A1 (CORIXA CORP [US]) 22 mai 1997 (1997-05-22) * le document en entier * * pages 2-4,6; revendications 1-38 *	1-10		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur		
8 décembre 2010		Boiangiu, Clara		
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>				

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1052784 FA 738075

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **08-12-2010**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 03068801	A2	21-08-2003	AU	2003216250 A1	04-09-2003
			BR	0307548 A	17-01-2006
			CA	2472922 A1	21-08-2003
			EP	1573002 A2	14-09-2005
			JP	2006506943 T	02-03-2006
			MX	PA04007583 A	25-04-2005

US 2003224397	A1	04-12-2003	US	2008299115 A1	04-12-2008
			US	2007037255 A1	15-02-2007
			US	2010291072 A1	18-11-2010

WO 9718475	A1	22-05-1997	AT	213544 T	15-03-2002
			AU	722152 B2	20-07-2000
			AU	1056897 A	05-06-1997
			BR	9611455 A	02-01-2001
			DE	69619405 D1	28-03-2002
			DE	69619405 T2	17-10-2002
			DK	874992 T3	25-03-2002
			EP	0874992 A1	04-11-1998
			ES	2168520 T3	16-06-2002
			JP	2000503111 T	14-03-2000
			PT	874992 E	30-08-2002
			US	5916572 A	29-06-1999
